

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-136979

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月26日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 1 2 N 9/28  
C 0 8 B 30/12  
C 1 2 S 3/02  
// (C 1 2 N 9/28  
C 1 2 R 1:07)

識別記号

F I

C 1 2 N 9/28  
C 0 8 B 30/12  
C 1 2 S 3/02

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-302245

(22) 出願日 平成8年(1996)11月13日

(71) 出願人 591112038

ナガセ生化学工業株式会社  
大阪府大阪市西区新町1丁目1番17号

(72) 発明者 小島 岩夫

京都府福知山市長田野町1-52 ナガセ生  
化学工業株式会社福知山工場内

(72) 発明者 鈴木 裕治

京都府福知山市長田野町1-52 ナガセ生  
化学工業株式会社福知山工場内

(72) 発明者 劉 曉麗

京都府福知山市長田野町1-52 ナガセ生  
化学工業株式会社福知山工場内

(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規酸性 $\alpha$ -アミラーゼ及びその製造法

(57) 【要約】

【課題】新規酸性 $\alpha$ -アミラーゼを提供し、酸性かつ高温条件下で澱粉を液化することにより、従来の澱粉分解工業における種々の問題点を一挙に解決すること。

【解決手段】以下の性質：

- 1) 基質特異性：澱粉に作用し、主としてマルトペンタオースおよびマルトヘキサオースを生成する；
  - 2) 至適pH：約pH4.0である；
  - 3) pH安定性：90℃、15分間の加熱条件下で約pH4.5～5.0で安定である；
  - 4) 温度安定性：pH4.5において15分間保持した場合、80℃まで安定である；
  - 5) 至適温度：約80℃～90℃である；
  - 6) 分子量：ゲル濾過法で約55,000～60,000である；および、
  - 7) 等電点：約4.2である；
- を有する酸性 $\alpha$ -アミラーゼ。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の理化学的性質を有する酸性 $\alpha$ -アミラーゼ：

- 1) 基質特異性：澱粉に作用し、主としてマルトペンタオースおよびマルトヘキサオースを生成する；
- 2) 至適pH：約pH4.0である；
- 3) pH安定性：100mM酢酸緩衝液中で90℃、15分間の加熱条件下で約pH4.5～5.0で安定である；
- 4) 温度安定性：100mM酢酸緩衝液中pH4.5において15分間保持した場合、80℃まで安定である；
- 5) 至適温度：約80℃～90℃である；
- 6) 分子量：ゲル濾過法で約55,000～60,000である；および、
- 7) 等電点：約4.2である。

【請求項2】さらに、至適温度が3mMのカルシウムイオンの存在による影響を受けない、請求項1に記載の酸性 $\alpha$ -アミラーゼ。

【請求項3】請求項1に記載の酸性 $\alpha$ -アミラーゼを製造する方法であって、バチルス属に属する微生物を培養する工程を包含する、方法。

【請求項4】前記微生物がバチルス アシドカルダリウス(*Bacillus acidocaldarius*)である請求項3記載の製造方法。

【請求項5】前記微生物がバチルス アシドカルダリウス(*Bacillus acidocaldarius*) KSTM-2037株である請求項4記載の製造方法。

【請求項6】澱粉を液化する方法であって、請求項1または請求項2に記載の酸性 $\alpha$ -アミラーゼと澱粉とを反応させる工程を包含する、方法。

【請求項7】前記酸性 $\alpha$ -アミラーゼがバチルス アシドカルダリウス(*Bacillus acidocaldarius*)から得られる、請求項6に記載の方法。

【請求項8】前記微生物が、バチルス アシドカルダリウス(*Bacillus acidocaldarius*) KSTM-2037株である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】前記反応が、85℃以上の温度で、pHが4.0から5.5の間で行われる、請求項8に記載の方法。

【請求項10】前記反応が、カルシウムを添加しない、請求項8に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本願発明は新規な酸性 $\alpha$ -アミラーゼ及びその製造方法、その新規な酸性 $\alpha$ -アミラーゼを用いる澱粉の液化方法に関する。更に詳しくは、バチルス属に属する微生物を培養することにより得られる酸性 $\alpha$ -アミラーゼ及びその製造方法、澱粉スラリーの液化方法に関する。

【0002】

【従来の技術】澱粉からブドウ糖、マルトースなどのオリゴ糖を生成させる工程は、 $\alpha$ -アミラーゼを用いる澱粉の液化工程とグルコアミラーゼによる糖化工程を含んでいる。トウモロコシ澱粉を原料とする場合には、二段液化法及びジェットクッカー法による液化が常法として用いられている。その方法は、まず、澱粉をpH6～6.5、95～105℃の条件下で*Bacillus licheniformis*や*Bacillus subtilis*等が生産する $\alpha$ -アミラーゼで液化させ、次いで、pH4.5、60℃の条件下で*Aspergillus niger*等が生産するグルコアミラーゼで糖化させるという工程を含んでいる。

【0003】これまでに知られている $\alpha$ -アミラーゼのほとんどは至適pHが6付近であるために、澱粉の液化においては水酸化カルシウムなどにより澱粉スラリーのpHを6付近まで上昇させた後、液化工程が実施されている。しかしながら、液化工程に次ぐ糖化工程では、現在主に使用されているグルコアミラーゼの至適pHが4.5付近であることから、再度pHを4.5付近に調整し直すという煩雑な工程が必要となっている。またpH6以上の液化では、アルカリ異性化により糖化後のグルコース収量の低下があると言われている。

【0004】更に、現在実用されている $\alpha$ -アミラーゼは $\alpha$ -アミラーゼの失活を抑制する目的でカルシウムイオン（工業的には95～105℃の条件下で澱粉の液化を行うには水酸化カルシウム等が3mM程度）が添加されるのが常法であるが、次の精製段階でのカルシウムイオンの除去工程も工程煩雑化の一因となっている。

【0005】上記問題点を解決すべく、pH4付近の酸性領域で作用しかつ耐熱性を有する各種 $\alpha$ -アミラーゼ分離され、研究されている。現在知られている*Bacillus acidocaldarius*由来の酸性 $\alpha$ -アミラーゼを表1に示す。

【0006】

【表1】

至適温度	至適pH	等電点	分子量	参照
75℃	3.5	ND	68000	J. of Bacteriol., 128, p515, 1976
70℃	3.5	ND	66000	Agric. Biol. Chem., 50, p23, 1986
70℃	2.0	ND	54000	Agric. Biol. Chem., 46, p7, 1982
60℃	4.5	ND	ND	Starch, 31, p166, 1979
80℃	3.5~4.0	5~6	60000~ 85000	特開平4-66084 (昭和電工)

【0007】しかしながら、未だ、高温で酸性条件下で澱粉の液化に使用し得る酵素が得られていないのが現状である。

【0008】他方で、近年活発に行われている超好熱菌の研究成果として、各種超耐熱性酵素が見いだされている。例えば、超好熱菌由来の超耐熱性中性 $\alpha$ -アミラーゼは、その活性がカルシウムイオンに依存せず、その超耐熱性ゆえに高温酸性条件下でトウモロコシ澱粉の液化に使用できる可能性がある。しかしながら、超好熱菌の酵素発現量は非常に低く、工業生産には遺伝子組み換え株として用いざるをえず、食品業界での使用は非常に困難である。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】従って、遺伝子組換えによらずに大量生産が可能であり、酸性側に至適pH及び安定pH範囲を有しかつ耐熱性である $\alpha$ -アミラーゼが求められている。

【0010】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、酸性側に至適pH及び安定pH範囲を有し、かつ耐熱性である $\alpha$ -アミラーゼを生産する菌株を求めるために広く自然界より検索した結果、京都府福知山市の土壤中から採取された*Bacillus acidocaldarius* KSTM-2037株が、上記目的を達成するものであることを発見し、本願発明を完成するに至った。*Bacillus acidocaldarius*由来の耐熱性かつ耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼは既に報告されているが(表1)、本願発明の $\alpha$ -アミラーゼの耐熱性はそれを上回るものであることから、新規酵素である。

【0011】

【発明の実施の形態】本願発明は、以下の1)から7)の理化学的性質を有する酸性 $\alpha$ -アミラーゼに関する。

【0012】1) 基質特異性: 澱粉に作用し、マルトペンタオースおよびマルトヘキサオースを生成する;

2) 至適pH: 約pH4.0である;

3) pH安定性: 100mM酢酸緩衝液中で90℃、15分間の加熱条件下で約pH4.5~5.0で安定である;

4) 温度安定性: 100mM酢酸緩衝液中pH4.5において15分間保持した場合、80℃まで安定である;

5) 至適温度: 約80℃~90℃である;

6) 分子量: ゲル濾過法で約55,000~60,000である; および、

7) 等電点: 約4.2である。

【0013】好適な実施態様においては、至適温度が3mMのカルシウムイオンの存在による影響を受けない酸性 $\alpha$ -アミラーゼである。

【0014】さらに、本願発明は、上記酸性 $\alpha$ -アミラーゼを製造する方法であって、バチルス属に属する微生物を培養する工程を包含する。

【0015】好適な実施態様においては、前記微生物がバチルス アシドカルダリウス(*Bacillus acidocaldarius*)である。

【0016】さらに好適な実施態様においては、前記微生物がバチルス アシドカルダリウス(*Bacillus acidocaldarius*) KSTM-2037株である。

【0017】また、本願発明は、澱粉を液化する方法であって、上記酸性 $\alpha$ -アミラーゼと澱粉とを反応させる工程を包含する。

【0018】好適な実施態様においては、前記酸性 $\alpha$ -アミラーゼがバチルス アシドカルダリウス(*Bacillus acidocaldarius*) から得られる。

【0019】さらに好適な実施態様においては、前記微生物がバチルス アシドカルダリウス(*Bacillus acidocaldarius*) KSTM-2037株である。

【0020】好適な実施態様においては、前記反応が、85℃以上の温度で行われる。

【0021】好適な実施態様においては、前記反応が、pHが4.0から5.5の間で行われる。さらに、好適な実施態様においては、前記反応が、カルシウムを添加しないで行われる。

【0022】以下、本願発明を説明する。

【0023】(本アミラーゼを生産する菌株の選択と同一) 本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼは、*Bacillus*属菌、特に*Bacillus acidocaldarius* KSTM-2037株) により生産される。この菌株は、京都府福知山市の土壤中から単離された。単離された微生物は、以下に示すような菌学的性状を示した。菌学的性質の試験及び分類法は「バージェズマニュアル」に従って行った。

【0024】

## A. 形態

- |            |                         |
|------------|-------------------------|
| (1) 細胞の形   | 桿菌(やや湾曲)                |
| (2) 細胞の大きさ | 0.4-0.6×1.5-3.0 $\mu$ m |
| (3) 運動性の有無 | +                       |
| (4) 胞子の有無  | +                       |
| (5) グラム染色  | +(幼若細胞)                 |
| (6) 坑酸性染色  | -                       |

## B. 各培地における生育状態

- |                       |                             |
|-----------------------|-----------------------------|
| (1) 標準寒天平板培養(pH5修正)   | 薄茶色, 光沢有り, スムーズ,<br>不正円(波状) |
| (2) 標準寒天斜面培養(pH5修正)   | 薄茶色, 光沢有り, スムーズ             |
| (3) 標準液体培養(pH5修正)     | 全体的にほぼ均一に混濁                 |
| (4) 標準ゼラチン穿刺培養(pH5修正) | 殆ど生育せず                      |
| (5) リトマスミルク           | 変化なし                        |

## C. 生理学的性質

- |                                  |                            |
|----------------------------------|----------------------------|
| (1) 硝酸塩の還元性                      | -                          |
| (2) 脱窒反応                         | -                          |
| (3) メチルレッド試験                     | ND                         |
| (4) VPテスト                        | -                          |
| (5) インドールの生成                     | -                          |
| (6) 硫化水素の生成                      | -                          |
| (7) 澱粉の加水分解                      | +                          |
| (8) クエン酸の利用                      | ND                         |
| (9) 無機窒素源の利用                     |                            |
| 硝酸塩                              | +                          |
| アンモニウム塩                          | +                          |
| (10) 色素の生成                       | -                          |
| (11) ウレアーゼ活性                     | ND                         |
| (12) オキシダーゼ活性                    | -                          |
| (13)カタラーゼ活性                      | +                          |
| (14) 生育の範囲                       |                            |
| pH                               | 6.0- 5.5+ 4.5+ 4.0-        |
| 温度                               | 40℃- 45℃+ 60℃+ 65℃-        |
| (15) 酸素に対する態度                    | 好気性                        |
| (16) ジオキシアセトンの生成                 | -                          |
| (17) 馬尿酸の分解                      | ND                         |
| (18) アミノ酸の分解                     | リジン ND アルギニン ND<br>オルニチンND |
| (19) フェニルアラニンの脱アミノ               | ND                         |
| (20) 温度抵抗性(85℃, 10分)             | +                          |
| (21) 塩化ナトリウムの耐性                  | 2.0%+ 5.0%- 7.0%- 10%-     |
| (22) サブロウ寒天培地における生育              | -                          |
| (23) 0.001%リゾチム培地の生育             | -                          |
| (24) チロシンの分解                     | -                          |
| (25) クエン酸・アンモニウム寒天培地<br>でのアルカリ産生 | ND                         |
| (26) カゼインの分解                     | -                          |
| (27) ゼラチンの分解                     | -                          |
| (28) 嫌気性培地における生育                 | -                          |
| (29) マッコンキー培地における生育              | -                          |

(30) レシチナーゼ反応	ND
(31) V P培地におけるアルカリ産生	ND
(32) 糖類の利用と生酸性	
(a) L-アラビノース	—
(b) D-キシロース	+
(c) D-グルコース	+
(d) D-マンノース	+
(e) D-フラクトース	+
(f) D-ガラクトース	+
(g) 麦芽糖	+
(h) ショ糖	—
(i) 乳糖	—
(j) トレハロース	+
(k) D-ソルビット	—
(l) D-マンニット	+
(m) イノシット	+
(n) グリセリン	+
(o) 澱粉	+
(p) メリビオース	—
(q) サリシン	±
(r) エタノール	—

\*ND: 測定できず

以上から、この微生物はバチルス アシドカルダリウス (*Bacillus acidocaldarius*) KSTM-2037株と命名され、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号はFERM P-15941である。

【0025】(培養方法)本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼは、例えば、この KSTM-2037株を培養して得られ得る。培養は、通常通気攪拌培養等により行われ得る。用いる培地には、当業者が通常用いる炭素源、窒素源、その他の必要な無機塩、ミネラルなどを含み得る。

【0026】炭素源としては、例えば、グルコース、蔗糖、転化糖等の他、資化し得る炭水化物、油脂、脂肪酸、アルコール(例えば、メタノール、エタノール)、各種澱粉、澱粉液化液、デキストリン等が、単独でまたは必要に応じて適宜混合して用いられ得る。

【0027】窒素源としては、例えば、ポリペプトン、酵母エキス、肉エキス、大豆粉、コーンステープリカー、コーンミル等の有機窒素源の他、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機窒素源が、単独でまたは必要に応じて適宜混合して用いられ得る。

【0028】無機塩およびミネラルとしては、例えば、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩、コバルト塩、ナトリウム塩、カリウム塩あるいは各種ビタミン類が、単独でまたは必要に応じて適宜混合して、用いられ得る。

【0029】培地のpHは通常pH4.5~5.5、好ましくはpH4.5~5.0である。培養温度は通常45~60℃、好ましくは55~60℃である。培養は、培養温度あるいは培養pH、通

気攪拌の条件等により変動するが、本願発明に用いる微生物の生育及び $\alpha$ -アミラーゼの生産に十分な時間を考慮すると、一般には18時間から3日間、行われる。

【0030】(酸性 $\alpha$ -アミラーゼの精製方法)本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼは以下のような方法により精製され得る。まず、培養液を遠心分離または濾過することによって菌体を分離して上清を得る。この上清から通常の精製手段、例えば、塩析法、例えばエタノール、アセトン等を用いる溶媒沈澱法、等電点沈澱法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過法、アフニティークロマトグラフィー法、晶出法などの通常の酵素の精製手段を単独で、あるいは適宜組み合わせることによって精製され得る。得られた酵素は凍結乾燥粉末とし得る。必要に応じて脱塩処理後、凍結乾燥され得る。

【0031】(力価測定法)

(基質溶液の調製)基質溶液を次のように調製する:無水物として1gの精製馬鈴薯澱粉を分散させながら0.4N-NaOHを25ml加え、沸騰水中で10分間加熱溶解する。この溶解液を冷却し、0.4N-CH<sub>3</sub>COOHを25ml加えて、pHをHClで4.5に調整した後、100mlに定容する。これにより、1(重量)%の馬鈴薯澱粉溶液が得られ、これを基質溶液とする。

【0032】(酵素活性の測定)基質溶液10mlに酵素液1mlを加えて40℃で10分間反応させ、その反応液1mlを取り出し1/10N HCl 10ml中に入れ反応を停止する。この反応停止した液を0.5ml取り、0.005%ヨード(ヨウ化カリ0.05%を含む)10mlに加え、生ずる青色の660 $\mu$ mに

おける吸光度を分光光度計にて測定し、次式によって、酵素活性(糊精化力)を計算する。

【0033】

【数1】

$$\text{酵素活性(糊精化力)} = \frac{D_0 - D}{D_0} \times \frac{100}{10} \times (\text{希釈率})$$

$D_0$  : 対照の吸光度

$D$  : 反応後の吸光度

【0034】上記測定法で、吸光度を40℃で、1分間に1%低下させたときの酸性 $\alpha$ -アミラーゼ活性(糊精化力)を1単位と定義する。

【0035】(酵素的性質の検討)上記の方法で得られた酸性 $\alpha$ -アミラーゼ(以下、本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼという)は、以下の方法でその性質を調べ得る。

【0036】1) 基質特異性: 本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼを、上記1重量%澱粉を含む基質溶液に、80℃、60分間の条件下、作用させる。反応後、反応液を薄層クロマトグラフィーで分析することにより、主としてマルトペンタオースおよびマルトヘキサオースが生成していることを確認し得る。生成物の検出は、シリカゲル60薄層プレート(メルク社製)を用い、イソプロピルアルコール: アセトン: 水=40:40:20で室温で展開したときに、マルトペンタオースは0.14、マルトヘキサオースは0.1のRf値を与える。なお、発色は、発色液(アニリン4ml、ジフェニルアミン4g、アセトン200ml、85%リン酸30mlの混合液)を用いて、105℃、30分加熱して行う。

【0037】2) 至適pH: 至適pHは、前記基質溶液のpHを種々変えて、80℃、10分間反応させて測定する。本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼの至適pHは、約pH4.0である。

【0038】3) pH安定性: 各pHの100mM酢酸緩衝液中で90℃、15分間処理した後、処理液の残存活性を前記力価測定法により、pH4.5、80℃、30分間反応させて測定する。本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼのpH安定性は、約pH4.5~5.0の範囲である。

【0039】4) 温度安定性: 100mM酢酸緩衝液pH4.5中で、各温度で15分間処理した後、処理液の残存活性を前記力価測定法により、pH4.5、80℃、30分間反応させて測定する。本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼは、80℃で15分処理後も100%の残存活性を有している。

【0040】5) 至適温度: 前記力価測定法により種々の温度で10分間反応させて測定する。本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼは、80~90℃に最適温度を有する。

【0041】6) 分子量: カラムとして、Sephadex-100を用い、10mM NaClを含む50mM酢酸緩衝液(pH5.0)中でゲル濾過して測定する。本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼの分子量は約55,000から約60,000である。

【0042】7) 等電点: 等電点電気泳動法を用いて測定し得る。本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼの等電点は4.2である。

【0043】さらに、本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼの

至適温度、至適pH、温度安定性、およびpH安定性は、カルシウムイオンの存在により影響されない。

【0044】本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼが精製されると、その(部分)アミノ酸配列を基に、この酸性 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を取得できる。このようにして得られた遺伝子配列(アミノ酸配列)を一部改変して、当業者は周知の方法を用いて、容易に本願発明と同等の酸性 $\alpha$ -アミラーゼを取得し得る。例えば、部位特異的突然変異、M13ファージを用いる欠失突然変異などの方法で遺伝子配列を改変して、変異型の酸性 $\alpha$ -アミラーゼを取得し得る。また、当業者に周知の変異方法を用いても、変異型の酸性 $\alpha$ -アミラーゼを取得し得る。従って、これらの変異型の酸性 $\alpha$ -アミラーゼであって、実質的に本願発明の酵素と同等の性質を有する酵素も本願発明の範囲内にある。

【0045】以下、実施例により本願発明の内容を更に具体的に説明するが、本願発明の範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【0046】

【実施例】

(実施例1)

(微生物の培養と酵素の精製)

1) シード培養

可溶性澱粉1%、ポリペプトン0.25%、酵母エキス0.25%、NaCl0.25%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%からなる培地(pH4.5)500mlを3L容三角フラスコに入れ、121℃で20分殺菌後、*Bacillus acidocaldarius* KSTM-2037を接種し、60℃、160rpmで2日間培養し、シードを得た。

【0047】2) 培養

1)と同じ組成の培地300Lを500L容培養タンクに入れ、121℃で20分殺菌後、上記シードを0.67%(2L)移植し、60℃、160rpmで3日間培養した。その結果、培養液1mlあたり4.9単位の $\alpha$ -アミラーゼが生産された。

【0048】3) 酵素の精製

$\alpha$ -アミラーゼを含む上記培養液を遠心分離(7,000rpm、30分)して、上清を得た。この上清をさらに限外濾過により濃縮後、凍結乾燥したものを粗酵素サンプルとした。粗酵素サンプルを蒸留水に溶解し、硫酸アンモニウムを40%飽和になるように加え5℃で一晩沈澱を生成させた。生成した沈澱を遠心分離により回収後、デリカ

スターH-100（三和澱粉工業(株)製）に吸着させた。吸着酵素を温蒸留水で溶出後、凍結乾燥し、酵素標品とした。

【0049】（実施例2）

（酵素的性質の検討）

1）最適反応温度

実施例1で得られた本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼ（5

単位）を1%可溶性澱粉（pH4.5）と10分間反応させ、本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼの活性の温度依存性及びカルシウムイオン添加による酵素活性への影響を調べた。結果を表2に示した。

【0050】

【表2】

力価測定 温度(℃)	相対活性(%) (CaCl <sub>2</sub> 無添加)	相対活性(%) (CaCl <sub>2</sub> 3mM添加)
60	40.7	40.0
65	52.0	52.7
70	65.1	66.1
75	82.0	81.8
80	100.0	100.0
85	100.0	100.0
90	100.0	100.0
95	31.0	30.7

【0051】表2より明らかなように、本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼは80~90℃に至適温度を持ち、その至適温度はカルシウムイオンの有無に依存しなかった。

【0052】2）至適pH

実施例1で得られた本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼ（5単位）を、1%可溶性澱粉と80℃で10分間反応させ、本

願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼの活性の至適pH、およびカルシウムイオン添加による酵素活性への影響を調べた。結果を表3に示した。

【0053】

【表3】

基質pH	相対活性(%) (CaCl <sub>2</sub> 無添加)	相対活性(%) (CaCl <sub>2</sub> 3mM添加)
2.0	0.0	0.0
2.5	21.7	0.0
3.0	59.4	60.2
3.5	94.2	94.3
4.0	100.0	100.0
4.5	94.2	95.1
5.0	87.0	85.7
5.5	69.6	70.0
6.0	26.1	28.6
6.5	0.0	0.0
7.0	0.0	0.0

【0054】表3より明らかなように、本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼはpH4.0に至適pHを持ち、その至適pHはカルシウムイオンの有無に依存しなかった。

【0055】3）温度安定性

実施例1で得られた本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼ（10単位）を、数種の温度で15分間処理後、残存活性を測定

し、本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼの温度安定性及び、カルシウムイオン添加による酵素活性への影響を調べた。結果を表4に示した。

【0056】

【表4】



処理 温度(℃)	相対活性(%) (CaCl <sub>2</sub> 無添加)	相対活性(%) (CaCl <sub>2</sub> 3mM添加)
60.0	100.0	100.0
65.0	100.0	100.0
70.0	100.0	100.0
75.0	100.0	100.0
80.0	100.0	100.0
85.0	88.8	87.0
90.0	49.0	45.0

【0057】表4より明らかなように、本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼは80℃まで安定であり、その温度安定性はカルシウムイオンの有無に依存しなかった。

【0058】4) pH安定性  
実施例1で得られた本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼ(10単位)を、数種のpHで15分間処理後、残存活性を測定

し、本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼのpH安定性、及びカルシウムイオン添加による酵素活性への影響を調べた。結果を表5に示した。

【0059】  
【表5】

処理pH	相対活性(%) (CaCl <sub>2</sub> 無添加)	相対活性(%) (CaCl <sub>2</sub> 3mM添加)
4.0	0.0	0.0
4.5	100.0	100.0
5.0	100.0	100.0
5.5	0.0	0.0
6.0	0.0	0.0

【0060】表5より明らかなように、本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼはpH4.5~5.0まで安定であり、そのpH安定性はカルシウムイオンの有無に依存しなかった。

【0061】(実施例3)  
(澱粉の液化) 約40(W/V)%のコーンスターチスラリーに15u/gDS(DS:基質乾物)の酸性 $\alpha$ -アミラーゼを添加し、スラリーのpHをHCl/NaOHにて4.5に調整した後、予め90℃程度に保持した水中に徐々に添加した。添加終了後、90℃でさらに10分間保持した後、温度を130℃に上

昇させた。上昇後、同温度で10分間保持した。約90℃に冷却後、再度 $\alpha$ -アミラーゼ 10u/gDSを添加し、90℃でさらに60分間保持した。対照として現在工業的に使用されている市販の $\alpha$ -アミラーゼ剤「スピターゼHS」(ナガセ生化学工業(株)製)をpH6で用いてテストを行った。その結果を表6に示した。なお、スピターゼHSの場合は、スラリーのpH調整をCa(OH)<sub>2</sub>で行った。

【0062】  
【表6】

	液化 pH	ヨード 反応	Bx (%)	DE (%)	糖組成(%)		
					G1	G2	G3
KSTM-2037 $\alpha$ -アミラーゼ	4.5	—	28	21.3	6.8	18.2	75.0
スピターゼHS	6.0	—	28	14.1	1.2	8.1	90.7

【0063】本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼは、従来使用されている中性 $\alpha$ -アミラーゼと比べても、遜色がないことがわかる。

【0064】(実施例4)  
(液化した澱粉の糖化) 実施例3で得られた澱粉液化液に、本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼを用いる場合にはpHを調整することなく、市販の糖化酵素剤「アミラックス

プラス」(ナガセ生化学工業(株)製) 4u/gDSを添加し、60℃にて48時間糖化反応を行った。スピターゼを用いた場合には、pHを4.5に調整して、同様に行った。その結果を表7に示した。

【0065】  
【表7】

	濾過性 (ml)	Bx (%)	糖組成 (%)		
			G1	G2	G3<
ESTN-2037 $\alpha$ -アミラーゼ	79	29.5	97.5	0.9	1.6
スピターゼHS	52	29.5	96.4	1.4	2.2

【0066】本願発明の酸性 $\alpha$ -アミラーゼを用いた場合には、濾過性およびG1収率において従来使用されている中性 $\alpha$ -アミラーゼに比べて良好な結果が得られた。

【0067】

【発明の効果】本願発明の新規酸性 $\alpha$ -アミラーゼは、高温かつ酸性条件下で澱粉の液化に使用され得る。酸性条件下で反応を行うことにより、アルカリ異性化による

糖化後のグルコース収量の低下が避けられる。また、活性にカルシウムイオンを必要としないので、従来の酵素を用いる場合に必要とされたカルシウムの添加が不要となるため、負荷の大きいカルシウムイオンの除去工程が省略できるとともに、グルコアミラーゼを用いる糖化工程で、再度pHを調製する必要がなく、グルコース製造工程における著しい改善が可能となった。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

(C 1 2 S 3/02

C 1 2 R 1:07)

(72)発明者 足立 朋子

京都府福知山市長田野町1-52 ナガセ生

化学工業株式会社福知山工場内



(19)

(11) Publication number:

**1**

Generated Document.

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**(21) Application number: **08302245**(51) Intl. Cl.: **C12N 9/28 C08B 30/12 C12**(22) Application date: **13.11.96**

(30) Priority:	(71) Applicant: <b>NAGASE SEIKAGAKU</b>
(43) Date of application publication: <b>26.05.98</b>	(72) Inventor: <b>KOJIMA IWAO</b> <b>SUZUKI YUJI</b> <b>RIYUU GIYUREI</b> <b>ADACHI TOMOKO</b>
(84) Designated contracting states:	(74) Representative:

**(54) NOVEL ACIDIC ALPHA-AMYLASE AND ITS PRODUCTION**

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To solve a variety of problems in the conventional starch industry by providing an acidic  $\alpha$ -amylase and liquefying starch under acidic and high- temperature conditions.

**SOLUTION:** This acidic  $\alpha$ -amylase has following properties: (1) substrate specificity: acting on starch to mainly produce malto-pentaose and malto-hexaose; (2) the optimal pH: about 4.0 (3) pH stability: it is stable in the pH range of 4.5-5.0 under heating at 90°C for 15 minutes; (4) temperature stability: it is stable up to 80°C, when it is kept at a pH of 4.5 for 15 minutes; (5) optimal temperature: about 80-90° C; (6) molecular weight: about 55,000-60,000 according to the gel filtration technique; and isoelectric point: about

## JAPANESE PATENT APPLICATION

Date of application: November 13<sup>th</sup>, '96  
Date of publication: May 26<sup>th</sup>, '98  
Applicant: Nagase Biochemical Ltd.  
Inventors: Iwao Kojima, Yuji Suzuki, Shorei Ryu,  
Tomoko Adachi  
Representative: Shusaku Yamamoto

**Title: Novel acid alpha-amylase and producing method**

### Summary:

Theme: All kinds of issue in starch degrading industry are solved by using novel acid alpha-amylase under acidic and high temperature condition.

Novel alpha-amylase:

- 1) Substrate specificity  
attack starch and end products are maltopentaose and maltohexaose mainly
- 2) Optimum pH  
around pH 4.0
- 3) pH stability  
around pH 4.5-5.0 under incubation at 90 centigrade for 15 min
- 4) Temp. stability  
up to 80 centigrade under incubation at pH 4.5 for 15 min
- 5) Optimum temp.  
around 80 - 90 centigrade
- 6) Molecular weight  
55,000 - 60,000 dalton by gelfiltration
- 7) Isoelectric point  
about 4.2

Others: Optimum temp. is not affected by 3 mM Ca<sup>2+</sup>. The novel enzyme is produced by *Bacillus acidocaldarius* KSTM-2037.

Table 2 : The effect of calcium ion to the activity

Activity analysis Temp. (centigrade)	Relative activity(%) (0mM CaCl <sub>2</sub> )	Relative activity(%) (3 mM CaCl <sub>2</sub> )
60	40.7	40.0
65	52.0	52.7

The novel acid alpha-amylase (5 units) reacted 1% soluble starch (pH4.5) for 10 min.